

5  
PCT/JP 99/02595

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

19.05.99

JP 99/12595

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 5月22日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第141426号

出 願 人

Applicant (s):

住友製薬株式会社  
株式会社高研

REC'D 09 JUL 1999

WIPO PCT

PRIORITY

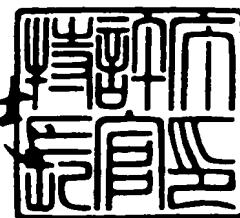
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山 佐 健 彦



出証番号 出証特平11-3041131

【書類名】 特許願

【整理番号】 161072

【提出日】 平成10年 5月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 48/00  
A61K 47/12  
A61K 47/26

【発明の名称】 安定な遺伝子製剤

【請求項の数】 19

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地 5-5-1 国立がんセンター研究所  
内

【氏名】 寺田 雅昭

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地 5-5-1 国立がんセンター研究所  
内

【氏名】 落谷 孝広

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市蔵垣内 1丁目3番45号 住友製薬株式会  
社内

【氏名】 佐野 明彦

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台 3丁目11番地 住友製薬株  
式会社内

【氏名】 久田 明彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市蔵垣内 1丁目3番45号 住友製薬株式会  
社内

【氏名】 永原 俊治

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 591071104

【住所又は居所】 東京都新宿区下落合3丁目5-18

【氏名又は名称】 株式会社高研

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】 100068526

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 恭生

【選任した代理人】

【識別番号】 100103230

【弁理士】

【氏名又は名称】 高山 裕貢

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 安定な遺伝子製剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 所望の遺伝子または該遺伝子を組み込んだベクターと少なくとも1種類の糖類および／または少なくとも1種類の非疎水性アミノ酸類および／または少なくとも1種類のカルボキシル基を2個以上有する有機酸類（アミノ酸類を除く）とを含む遺伝子製剤。

【請求項2】 糖類が、単糖、二糖、三糖以上のオリゴ糖またはそれらの糖アルコールである請求項1記載の遺伝子製剤。

【請求項3】 糖類が、グルコース、ガラクトース、フルクトース、シュクロース、マルトース、ラクトース、トレハロース、ソルビトールまたはマンニトールである請求項2記載の遺伝子製剤。

【請求項4】 非疎水性アミノ酸類が、グルタミン酸、アスパラギン酸またはその塩である請求項1記載の遺伝子製剤。

【請求項5】 カルボキシル基を2個以上有する有機酸類が、カルボキシル基を2個もしくは3個有する有機酸またはその塩である請求項1記載の遺伝子製剤。

【請求項6】 カルボキシル基を2個もしくは3個有する有機酸が、クエン酸または酒石酸である請求項5記載の遺伝子製剤。

【請求項7】 所望の遺伝子を組み込んだベクターがプラスミドDNAである請求項1ないし6いずれかに記載の遺伝子製剤。

【請求項8】 溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態である遺伝子製剤または溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態の工程を経て製造される遺伝子製剤において、溶液状態、ゲル状態または懸濁液状態における糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類の全体に対する含有量が約1w/v%以上である請求項1記載の遺伝子製剤。

【請求項9】 細胞への遺伝子導入を促進する物質をさらに含む請求項1ないし8いずれかに記載の遺伝子製剤。

【請求項 10】 細胞への遺伝子導入を促進する物質が、カチオン性脂質、カチオン性ポリマーまたは疎水性ポリマーである請求項 9 記載の遺伝子製剤。

【請求項 11】 医学的に許容される添加剤をさらに含む請求項 1 ないし 10 記載の遺伝子製剤。

【請求項 12】 添加剤が生体親和性材料である請求項 11 記載の遺伝子製剤。

【請求項 13】 所望の遺伝子または該遺伝子を組み込んだベクターが生体親和性材料に担持されていることを特徴とする請求項 12 記載の遺伝子製剤。

【請求項 14】 生体親和性材料が、コラーゲン、ゼラチンまたはそれらの混合物である請求項 12 または 13 記載の遺伝子製剤。

【請求項 15】 乾燥状態にある請求項 1 ないし 14 いずれかに記載の遺伝子製剤。

【請求項 16】 溶液状態、ゲル状態あるいは懸濁液状態である所望の遺伝子または該遺伝子を組み込んだベクターを含む調製物を乾燥工程に付することにより得られる請求項 1 ないし 15 いずれかに記載の遺伝子製剤。

【請求項 17】 乾燥工程が凍結乾燥である請求項 16 記載の遺伝子製剤。

【請求項 18】 所望の遺伝子または該遺伝子を組み込んだベクターを含む遺伝子調製物に、少なくとも 1 種類の糖類および／または少なくとも 1 種類の非疎水性アミノ酸および／または少なくとも 1 種類のカルボキシル基を 2 個以上有する有機酸類（アミノ酸類を除く）を添加することからなる、遺伝子製剤を安定化する方法。

【請求項 19】 請求項 1 ないし 17 いずれかに記載の遺伝子製剤を生体に投与することからなる、遺伝子治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、医療分野において疾病の治療あるいは予防を目的として実施される遺伝子治療に使用される安定な遺伝子製剤に関する。さらに詳細には、本発明は製造工程中および組成物の保存安定性が良好な遺伝子または該遺伝子を組み込ん

だベクターを含有する製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、遺伝子治療に関する研究が盛んに行われるようになり、試験的に臨床応用が実施されるに至って、その汎用化への期待は大変大きなものである。遺伝子治療に関する研究の初期においては、治療を目的として細胞に導入される遺伝子の導入効率が高いことを主たる理由としてウイルスをベクターとして用いる手法が専ら研究されてきた。しかしながら、自己翻訳能力を有するプラスミドDNA(pDNA)を動物の筋肉内に直接投与することで遺伝情報を発現できることが見いだされて以来、pDNAを用いる遺伝子治療法はウイルスベクターを用いた方法に比べて安全性が高く、pDNAがウイルスベクターに比べて工業的に生産しやすいため、汎用化に適した方法として盛んに研究されるようになってきている。

【0003】

pDNAを用いる遺伝子治療方法に関する基礎研究の分野における現在の最大の関心事は、pDNAの細胞への導入効率の向上と遺伝情報発現期間の延長である。pDNAの細胞への導入効率の向上を目的としては、pDNAをカチオン性のリポソームに封入する方法やポリオマーと複合体を形成させる方法が報告されている。また、遺伝情報発現期間を延長することを目的としては、生体との親和性が高いコラーゲン（特開平9-71542）あるいはポリエチレンビニル酢酸（Journal of Controlled Release 47, 123, (1997)）を担体として用いた徐放性製剤に関する報告がなされている。これらの研究報告は上記の目的に焦点を絞った研究であるが、遺伝子治療の汎用的な利用を目的として一定の高品質な製剤を安定に、かつ経済的に供給するためのさらなる改良が望まれる。

【0004】

製剤技術的な観点に立脚した場合、主薬たる遺伝子の生物活性が製剤の製造工程あるいは保存中において安定に保つことも重要な課題である。実際、閉環状のpDNAを制限酵素で線状にしたpDNAを筋肉内に投与すると遺伝情報の発現が閉環状のpDNAを投与した場合の10%程度であることが知られており、pDNAの一次構造を製造工程中あるいは様々な条件が予想される保存中に保つことが遺伝子治療用製

剤を広く供給する場合に重要な課題となる。

【0005】

先述の基礎的な研究においてもpDNAの保存時の安定性について言及した報告が一部にあるが(Proceedings of National Academy of Sciences of the USA, 93, 7305 (1996))、遺伝子を含む製剤の製造あるいは製剤の安定性について系統的な検討はこれまで殆どなされてこなかったのが実状である。実際、後述の試験例に示すように、pDNAを単独で含む、またはpDNAの導入効率を高めるための化合物もしくは遺伝子発現期間を延長するための化合物を添加した遺伝子調製物を、製剤化工程で一般に用いられる凍結乾燥条件に曝した場合、あるいは品質が安定に保持されるべき保存状態に曝した場合、pDNAは分解を受け生物活性が著しく損なわれてしまうのである。

従って、pDNA等の遺伝子を含む製剤を安定に製造あるいは保存することが可能な組成物の開発が、遺伝子治療の汎用化に極めて重要である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、医療分野において疾病の治療あるいは予防を目的として実施される遺伝子治療に使用される遺伝子製剤において、製造工程中あるいは保存中において主薬たる遺伝子の生物学的な活性を安定に保持している、汎用に供することのできる遺伝子製剤を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、安定な遺伝子製剤を得ることを目的として鋭意研究を重ねた結果、pDNAを含む溶液中に糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を添加した場合、溶液状態での保存中および／または当該溶液を凍結乾燥する工程中および／または当該溶液の乾燥品の保存中でのpDNAの分解が大きく抑えられることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は次のとおりである。

- (1) 所望の遺伝子または該遺伝子を組み込んだベクターと少なくとも1種

類の糖類および／または少なくとも1種類の非疎水性アミノ酸類および／または少なくとも1種類のカルボキシル基を2個以上有する有機酸類（アミノ酸類を除く）とを含む遺伝子製剤。

（2） 糖類が、単糖、二糖、三糖以上のオリゴ糖またはそれらの糖アルコールである（1）記載の遺伝子製剤。

（3） 糖類が、グルコース、ガラクトース、フルクトース、シュクロース、マルトース、ラクトース、トレハロース、ソルビトールまたはマンニトールである（2）記載の遺伝子製剤。

（4） 非疎水性アミノ酸類が、グルタミン酸、アスパラギン酸またはその塩である（1）記載の遺伝子製剤。

（5） カルボキシル基を2個以上有する有機酸類が、カルボキシル基を2個もしくは3個有する有機酸またはその塩である（1）記載の遺伝子製剤。

（6） カルボキシル基を2個もしくは3個有する有機酸が、クエン酸または酒石酸である（5）記載の遺伝子製剤。

（7） 所望の遺伝子を組み込んだベクターがプラスミドDNAである（1）ないし（6）いずれかに記載の遺伝子製剤。

【0008】

（8） 溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態である遺伝子製剤または溶液状態、ゲル状態もしくは懸濁液状態の工程を経て製造される遺伝子製剤において、溶液状態、ゲル状態または懸濁液状態における糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類の全体に対する含有量が約1 w/v %以上である（1）記載の遺伝子製剤。

（9） 細胞への遺伝子導入を促進する物質をさらに含む（1）ないし（8）いずれかに記載の遺伝子製剤。

（10） 細胞への遺伝子導入を促進する物質が、カチオン性脂質、カチオン性ポリマーまたは疎水性ポリマーである（9）記載の遺伝子製剤。

（11） 医学的に許容される添加剤をさらに含む（1）ないし（10）記載の遺伝子製剤。

（12） 添加剤が生体親和性材料である（11）記載の遺伝子製剤。



(13) 所望の遺伝子または該遺伝子を組み込んだベクターが生体親和性材料に担持されていることを特徴とする(12)記載の遺伝子製剤。

(14) 生体親和性材料が、コラーゲン、ゼラチンまたはそれらの混合物である(12)または(13)記載の遺伝子製剤。

(15) 乾燥状態にある(1)ないし(14)いずれかに記載の遺伝子製剤。

(16) 溶液状態、ゲル状態あるいは懸濁液状態である所望の遺伝子または該遺伝子を組み込んだベクターを含む調製物を乾燥工程に付することにより得られる(1)ないし(15)いずれかに記載の遺伝子製剤。

(17) 乾燥工程が凍結乾燥である(16)記載の遺伝子製剤。

(18) 所望の遺伝子または該遺伝子を組み込んだベクターを含む遺伝子調製物に、少なくとも1種類の糖類および／または少なくとも1種類の非疎水性アミノ酸および／または少なくとも1種類のカルボキシル基を2個以上有する有機酸類(アミノ酸類を除く)を添加することからなる、遺伝子製剤を安定化する方法。

(19) (1)ないし(17)いずれかに記載の遺伝子製剤を生体に投与することからなる、遺伝子治療方法。

#### 【0009】

##### 【発明の実施の形態】

上記のように、本発明の要旨は、所望の遺伝子または該遺伝子を組み込んだベクターと少なくとも1種類の糖類および／または少なくとも1種類の非疎水性アミノ酸類および／または少なくとも1種類のカルボキシル基を2個以上有する有機酸類とを含む遺伝子製剤である。本発明製剤は別の局面では、これら糖類、アミノ酸および／または有機酸類を含む、含有される遺伝子またはベクターの安定化(分解抑制作用)増強製剤である。

#### 【0010】

「所望の遺伝子」としては、遺伝子治療が可能な遺伝子であればいずれでもよい。ここに、遺伝子治療とは、遺伝子を用いて行われる治療を意味する。例えば、遺伝子治療時に発現が要求されるタンパク質の遺伝子情報をコードする遺伝子

、細胞内で特定のDNAやRNAと対合し遺伝子の発現を抑制するアンチセンス配列が挙げられる。アンチセンス配列は、ベクター等に組み込まれることなく使用することができる。

「所望の遺伝子を組み込んだベクター」としては、細胞内に導入されたとき、コードした遺伝情報を細胞内で発現するように構成された形態が好ましく、プロモーター等、目的遺伝子の発現に必要な要素を含有する、あるいは染色体への組み込みを可能とする要素を含有するベクター、例えばpDNAが挙げられる。

本発明の遺伝子製剤中には、別個の所望の遺伝子を組み込んだ数種類のベクターが同時に存在してもよい。また、一つのベクターには複数の遺伝情報がコードされていてもよい。遺伝子製剤中に含有されるベクターの量に特に制限はない。

#### 【0011】

遺伝子治療時に発現が要求されるタンパク質をコードする遺伝子には遺伝病の処置に用いられ得る遺伝子、例えばアデノシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼ等の酵素類、GM-CSF、IL-2等のサイトカイン類、または繊維芽細胞増殖因子HST-1(FGF4)をコードする遺伝子が挙げられるがこれに限られるものではない。また、遺伝子治療時に発現が要求される別のタンパク質をコードする遺伝子として、発現されるタンパク質あるいはペプチドが抗原として免疫を誘導し、感染症もしくは腫瘍の予防または治療を行うことを目的とする遺伝子、即ち上記の抗原となり得るタンパク質あるいはペプチドをコードする遺伝子、例えばインフルエンザウイルスの表面タンパク質であるHAやNAまたは核タンパク質であるNPの各タンパク質、C型肝炎ウイルスのE2やNS 1タンパク質、B型肝炎ウイルスのHBs抗原タンパク質、A型肝炎ウイルスのカプシドタンパク質であるVP 1やVP 3、あるいはカプシド様タンパク質、デングウイルスのEgpタンパク質、RSウイルスのFあるいはGタンパク質、狂犬病ウイルスの構造タンパク質であるGやNタンパク質、ヘルペスウイルスのgDタンパク質、日本脳炎ウイルスのE 1あるいはpre-Mタンパク質、ロタウイルスの外殻糖タンパク質VP 7や外殻タンパク質VP 4、ヒト免疫不全ウイルスのgp120やgp160タンパク質、Leishmania majorの主要表面抗原タンパク質、マラリアのスプロゾイドの主要表面抗原(circum sporozoite protein)タンパク質、トキソプラズマの54-kdやCSタンパク質、虫歯の原因となるStre

ptococcus mutansの菌体表層タンパク質Pacをコードする遺伝子；また、MAGE-1、MAGE-3またはBAGEなどの癌退縮抗原や、チロシナーゼ、Mart-1、gp100、gp75などの組織特異抗原、p15、Mucl、CEA、HPV E6、E7、HPR2/neuなどをコードする遺伝子、および「Immunization with DNA」:Journal of Immunological Methods,176巻,1994年,145-152頁に記載されている遺伝子の核酸を挙げることができるが、これに限定されるものではない。

#### 【0012】

「糖類」としては、医学上許容される単糖、二糖、三糖以上のオリゴ糖もしくはこれらの糖アルコールまたはこれらの誘導体が挙げられる。本発明の遺伝子製剤に添加されることにより、製剤の安定性を改善するならば、糖類の種類は特に限定されない。また、本発明遺伝子製剤は2種類以上の糖類の混合物を含有することができる。

糖類としては例えば、単糖としてグルコース、ガラクトース、フルクトース等が挙げられ、好ましくはグルコースである。二糖としてはシュクロース、マルトース、ラクトース、トレハロースが好ましい例として挙げられる。

糖アルコールとしてはソルビトール、マンニトール等が挙げられ、好ましくはマンニトールである。

糖誘導体には、デオキシ糖、アミノ糖、リン酸エステル類等、およびこれらを構成成分とする二糖がある。

#### 【0013】

「非疎水性アミノ酸類」とは、アミノ酸類の中でも、非疎水性の性質を有するアミノ酸類を意味する。ここに、「非疎水性」とは、水との親和性が比較的強い性質を意味し、本発明では、フェニルアラニンの水親和性を基準として、それよりも水親和性が強い性質を「非疎水性」と称する。なお、水親和性を数値化する指標は、例えばKyte,J.&Doolittle,R.F.,1982, J.Mol.Biol.157,105-132に記載されている。この基準によれば、非疎水性でないアミノ酸、即ち本発明にける有機酸類に含まれないアミノ酸はフェニルアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンである。「アミノ酸類」としては医学上許容されるアミノ酸およびその塩、ならびにこれらの誘導体が挙げられる。本発明の遺伝子製剤に添加されること

により、製剤の安定性を改善するならばアミノ酸類はこれらに限定されない。

アミノ酸としてはグルタミン酸またはアスパラギン酸などの酸性アミノ酸のみならず、一般に塩基性アミノ酸として分類されるリジン、アルギニン、ヒスチジン、および酸性、塩基性アミノ酸以外のグリシン、アラニン、メチオニン、プロリン、シスチン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミンも包含される。よって、本発明におけるアミノ酸類とは、その水溶液における液性とは無関係であり、他に塩基性あるいは中性の側鎖が存在しているアミノ酸も包含される。アミノ酸の塩としてはナトリウム塩、カリウム塩等が挙げられる。

【0014】

「カルボキシル基を2個以上有する有機酸」としては、医学上許容されるカルボキシル基を2個以上有する有機酸（アミノ酸を除く）およびその塩、ならびにこれらの誘導体が挙げられる。本発明の遺伝子製剤に添加されることにより、製剤の安定性を改善するならば有機酸類の種類は特に限定されない。

カルボキシル基を2個以上有する有機酸およびその塩として、好ましくはカルボキシル基を2あるいは3個含む有機酸およびその塩が挙げられ、より好ましくは飽和または不飽和脂肪族の該有機酸である。カルボキシル基を2あるいは3個含む有機酸およびその塩として、例えばクエン酸、酒石酸、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸およびその塩が挙げられ、好ましくはクエン酸、酒石酸の塩である。

【0015】

本発明の遺伝子製剤には、上記の糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類のいずれかを含有する製剤およびこれらのうち任意の2者または3者すべてを含有する製剤が含まれ、またいずれの場合でも糖類、アミノ酸類および有機酸類ともに一種以上を含有することができる。

【0016】

本発明の遺伝子製剤における、糖類、非疎水性アミノ酸類、カルボキシル基を2個以上有する有機酸類の個別の、あるいはこれらを混合して用いた場合の全体の含有量は、本発明製剤に含有される遺伝子またはベクターの分解を抑制する効果が得られる量以上に設定することが望ましいが、該遺伝子またはベクターの濃度および量あるいは遺伝子製剤の実施形態によって適宜設定することができる。

例えば、pDNAを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で溶解した $150\text{mM}$  NaCl, $10\text{mM}$  Tris-HCl(pH7.4)溶液を凍結乾燥して目的の遺伝子製剤を得る、あるいはこのようにして乾燥した遺伝子製剤を保存する場合には、 $1\%$ (w/v)以上の糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を溶液に含有することが好ましい。なお、乾燥前あるいは実施形態である溶液状態の遺伝子製剤の通常用いられるpHはpH5～pH8の範囲であるが、好ましくはpH6～pH8の範囲であり、より好ましくはpH7～pH8の範囲である。

## 【0017】

本発明遺伝子製剤には、上記の糖類、非疎水性アミノ酸類および有機酸類以外に、医学的に許容される添加剤あるいは遺伝子発現を改善し得る物質を添加することができる。糖類、非疎水性アミノ酸類および有機酸類の量は従ってこれらの添加剤の種類および量によっても変動し得る。

医学的に許容される添加剤として、例えば生体親和性材料あるいはゴマ油、スクワレン等の油類等が挙げられるがこれに限定されるものではない。

添加剤として使用する生体親和性材料に所望の遺伝子または該遺伝子を含むベクターを担持させれば、本発明遺伝子製剤を徐放性製剤にすることができる。ここに言う生体親和性材料とは、例えば、1) コラーゲン、ゼラチン、フィブリン、アルブミン、ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、キチン、キトサン、アルギン酸、ペクチン、アガロースおよびアラビアゴム、2) グリコール酸、乳酸、アミノ酸の重合体およびこれらの二以上の共重合体、ならびに、3) ハイドロキシアパタイト、ポリメタクリル酸メチル、ポリジメチルシロキサン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレンおよびポリエチレン等を挙げることができるがこれに限られるものではない。好ましい例として、コラーゲン、ゼラチンまたはその混合物が挙げられる。

ここに、「担持させる」とは、所望の遺伝子または該遺伝子を含むベクターを生体親和性材料に均一に分散または包括させることを意味する。

## 【0018】

遺伝子発現を改善し得る物質としては、遺伝子の細胞への導入を促進する物質または遺伝子の核への移行を促進する物質を挙げることができる。前者の例とし

て、カチオン性脂質、カチオン性ポリマー、疎水性ポリマー等を挙げることができる。「カチオン性脂質」として、DOTMA (N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N-トリメチルアンモニウムクロライド)、DOSPA (2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スぺルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート)、DDAB (ジメチルジオクタクレシルアンモニウムブロミド)、TM-TPS (N,N<sup>I</sup>,N<sup>II</sup>,N<sup>III</sup>-テトラメチル-N,N',N'',N'''-テトラパルミチルスぺルミン)、DMRIE (1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド)、N-( $\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタメートクロライド (Biochemical Biophysical Research Communication, 196, 1042 (1994)) 等が挙げられ、これらのカチオン性脂質とDOPE (ジオレイルホスファチジルエタノールアミン) 等の中性脂質からなるカチオン性リポソーム、カチオン性脂質とコレステロールとの混合物も用いることができる。「カチオン性ポリマー」は遺伝子と静電的な相互作用をするポリマーであり、例えばDOGS (ジオクタデシルアミドグリシルスぺルミン) 等のリポポリアミン、AlkC WK<sub>18</sub> 等のペプチド、ポリリジンやその誘導体 (Proceedings of Academy Sciences of the USA, 89, 6094 (1992)) 等のカチオン性ポリアミノ酸およびその誘導体、ポリエチレンイミン、ポリアミドアミンデンドリマー等が挙げられる。「疎水性ポリマー」は遺伝子と疎水的な相互作用をするポリマーであり、例えばポリビニルアルコールやポリビニルピロリドン等が挙げられる。その他、AlkC WK<sub>18</sub> 等のペプチドも用いることができる。ここに、カチオン性リポソームとしては、例えばDOSPAとDOPEを1:1で含むLIPOFECTAMINE (登録商標、Life Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA)、DOTMAとDOPEを1:1で含むリポソーム、DDABとDOPEを1:2.5で含むLIPOFECTACE (登録商標、Life Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA)、TM-TPSとDOPEを1:1.5で含むCELLFECTIN (登録商標、Life Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA) 等を挙げることができるが、これらに限定されない。また、ここで言うカチオン性脂質とコレステロールの混合物とは、例えばDMRIEとコレステロールのモル比で1:1の混合物であるDMRIE-C (Life Technologies, Inc., ロックビル, MD, USA) を挙げることができる。ある

いは、遺伝子の細胞内におけるエンドソームでの分解を抑えるために、例えばエンドソームの内容物を放出する能力を有する不活化したアデノウイルス、CHEMS（コレステロールヘミスクシネートモルホリン塩）等を用いることもできる。

遺伝子の核への移行を促進する物質としては、HMG-1、2 混合物（high mobility group-1,2 mixture：実験医学，12，184(1994)）等を挙げることができる。

【0019】

本発明遺伝子製剤の形状には特に制限はなく、例えば溶液状、懸濁液状、ゲル状、スポンジ状、粉末状、微粒子状、棒状、フィルム状などの形態をとることができる。

【0020】

溶液状の遺伝子製剤の製造方法としては、例えば、

- 1) 必要に応じて添加剤を添加した、所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクターの溶液に糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を加えて溶解し、均一な溶液状態の遺伝子製剤を得る方法、および
- 2) 必要に応じて添加剤を添加した所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクターの溶液に糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類の溶液を加えて混合し、均一な溶液状態の遺伝子製剤を得る方法、が挙げられる。

【0021】

微粒子状の遺伝子製剤の製造方法としては、例えば、

- 1) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を噴霧乾燥する方法、および
- 2) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎する方法、が挙げられる。

【0022】

棒状の遺伝子製剤の製造方法としては、例えば、

1) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を噴霧乾燥して得られた微粒子を棒状に圧縮成形する方法、

2) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を凍結乾燥し、得られたスポンジを粉碎して得られた微粒子を棒状に圧縮成形する方法、

3) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を凍結乾燥し、得られたスポンジを棒状に圧縮成形する方法、

【0023】

4) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を凍結乾燥し、得られたスポンジに水等を加えた後、練合し、ノズルから棒状に押し出し、乾燥する方法、および

5) 所望の遺伝子または該遺伝子を含有するベクター、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類、さらに必要に応じて添加剤を添加した溶液を噴霧乾燥し、得られた微粒子を液状あるいは混粘可能な程度に柔らかいゴム状のシリコンと混合し、硬化剤を加え、ノズルから棒状に押し出す方法、が挙げられる。

【0024】

本発明の遺伝子製剤は、治療目的の疾患、標的臓器等に応じ、種々の方法で投与することができる。例えば、皮下、筋肉内等に投与することができ、また腎臓、肝臓、肺、脳等の疾患の対象部位に直接投与することができる。疾患部位に直接投与すれば臓器選択的に治療することができる。



## 【0025】

本発明により得られる遺伝子製剤の効果を、所望の遺伝子を含むベクターとしてプラスミドDNA (pDNA) を用いた場合を例に以下説明する。

1) pDNA単独あるいはpDNAと糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類以外の添加物（医学的に許容される添加剤、生体親和性材料、遺伝子導入を促進する物質等）を含む溶液を製剤化すべく一般に用いられる凍結乾燥に付した場合、いずれの場合も凍結乾燥後にpDNAの分解がみられるが、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を含む組成で凍結乾燥した場合、これらを含まない組成で凍結乾燥した場合に比べて、pDNAの分解が抑制された。

2) pDNA単独あるいはpDNAと糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類以外の添加物（医学的に許容される添加剤、生体親和性材料、遺伝子導入を促進する物質等）を含む溶液を乾燥させて得た乾燥品を40℃で保存した場合、いずれの場合もpDNAの分解が見られるが、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を含む組成の溶液を乾燥させて得た乾燥品を保存した場合、これらを含まない場合に比べて、pDNAの分解が抑制された。

## 【0026】

このような糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を含む組成によるpDNAの安定化効果は、上記のような乾燥工程および乾燥状態での保存時のみならず、溶液状態でも得ることができる。特に、遺伝子の導入効率を向上させることを目的に用いられるカチオン脂質類を含む組成でその効果が顕著である。すなわち、

3) pDNA単独あるいはpDNAと糖類、非疎水性アミノ酸類およびカルボキシル基を2個以上有する有機酸類以外の添加物（医学的に許容される添加剤、生体親和性材料、遺伝子導入を促進する物質等）およびカチオン脂質類を含む組成の溶液を溶液状態で保存した場合、いずれの場合もpDNAの分解が見られるが、糖類および／または非疎水性アミノ酸類および／またはカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を含む組成の溶液を保存した場合、これらを含まない場合に比べ

て、pDNAの分解が抑制された。

前記本発明製剤の遺伝子分解抑制（安定化）効果は、後述の試験例と表9に具体的に示されている。

【0027】

また、本発明で得られたHST-1/FGF4をコードするpDNAとコラーゲンおよびグルコースからなる棒状の遺伝子製剤をマウスの筋肉内に投与した場合、投与後38日間に亘って血中にpDNAが検出され、投与後60日以上に亘ってHST-1遺伝子の発現が血中および投与部位で認められた。一方、溶液でpDNAを投与した場合には、投与後30日間しかHST-1遺伝子の発現が認められなかった。この結果は、pDNAはコラーゲンおよびグルコースからなる棒状の遺伝子製剤から徐放されたのと同時に、遺伝子製剤内で長期間安定に保存されていることを示している。

【0028】

【実施例】

以下に実施例、参考例および試験例を挙げ、本発明を更に詳細に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例および試験例により限定されるものではない。

以下の実施例においては、繊維芽細胞増殖因子HST-1(FGF4)の遺伝子(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2980-2984(1987))を組み込んだプラスミドベクターpCAHST-1を含む製剤の調製につき説明する。HST-1遺伝子産物は巨核球に対して血小板増加因子として作用するものであり、癌の化学療法や放射線療法の際の重篤な副作用である血小板減少症を効果的に抑制することが明らかとなっている(J.Clin.Invest.,96:1125-2230,1995, Oncogene, 13:9-19, 1996)。pCAHST-1は、発現ベクターpCAGGS(Gene, 108, 193-200 (1991))のCAGプロモーター部とポリA配列との間にHST-1遺伝子を組み込んだプラスミドベクターである。なお、CAGプロモーターは、高発現ベクターとして特開平3-168087号公報に記載されている。

【0029】

実施例1

アミノ酸を含有する遺伝子製剤（乾燥状態）

10  $\mu$ g/ml のpCAHST-1および10 mg/ml のグリシン、アラニン、グル

タミン酸一ナトリウムまたはリジン塩酸塩を含有する150mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH7.4)溶液をそれぞれ調製した。調製した溶液の1mlを-40℃で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このように凍結乾燥によって、乾燥状態の遺伝子製剤を調製した。

【0030】

## 実施例2

### 糖類を含有する遺伝子製剤（乾燥状態）

10μg/mlのpCAHST-1および10mg/mlのグルコース、シュクロース、マルトース、ラクトースまたはマンニトールを含有する150mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH7.4)溶液をそれぞれ調製した。調製した溶液の1mlを-40℃で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このように凍結乾燥によって、乾燥状態の遺伝子製剤を調製した。

【0031】

## 実施例3

### カルボキシル基2個以上を含む有機酸類およびアミノ酸を含有する遺伝子製剤（乾燥状態）

10μg/mlのpCAHST-1および10mg/mlのグルタミン酸一ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム二水和物またはクエン酸三ナトリウム二水和物を含有する150mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH7.4)溶液を調製した。調製した溶液の1mlを-40℃で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このように凍結乾燥によって、乾燥状態の遺伝子製剤を調製した。

【0032】

## 実施例4

### 糖類およびカチオン性脂質を含有する遺伝子製剤（乾燥状態）

3μg/mlのpCAHST-1、24μg/mlのDMRIE-C (Gibco BRL社製、遺伝子導入促進成分) および10mg/mlのシュクロースを含有する150mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH7.4)溶液を調製した。調製した溶液の1mlを-40℃で凍結させた後、陰圧下室温で一晩乾燥した。このように凍結乾燥によって、乾燥状態の遺伝子製剤を調製した。

【0033】

実施例 5

糖類および遺伝子導入促進成分を含有する遺伝子製剤（溶液状）

150mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH7.4)溶液に、pCAHST-1、DMRIE-C (Gibco BRL社製) およびグルコースをそれぞれの最終濃度が  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $24 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \text{mg}/\text{ml}$  になるように混合した。このようにして、液状の遺伝子製剤を得た。

【0034】

実施例 6

徐放性遺伝子製剤（ゲル状）

$0.1 \text{w}/\text{w}\%$  アテロコラーゲン溶液 ( $500 \text{mg}$ ) に  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  の pCAHST-1 溶液 ( $200 \mu\text{l}$ ) および  $10 \text{mg}/\text{ml}$  のグルコース、シュークロースまたはグルタミン酸ナトリウム溶液 ( $500 \mu\text{l}$ ) を加え、混合後  $37^\circ\text{C}$  に保温することによって、ゲル状の遺伝子製剤を調製した。なお、本実施例および以下の実施例・参考例において用いたアテロコラーゲンは（株）高研から入手できる。

【0035】

実施例 7

徐放性遺伝子製剤（スポンジ状）

実施例 6 で調製した、グルコースを含有するゲル状の遺伝子製剤を凍結乾燥した。これにより  $500 \mu\text{g}$  のアテロコラーゲン、 $20 \mu\text{g}$  の pCAHST-1、 $5 \text{mg}$  のグルコース、シュークロースまたはグルタミン酸ナトリウム塩を含有するスポンジ状の遺伝子製剤を得た。

【0036】

実施例 8

徐放性遺伝子製剤（棒状）

$0.86 \text{w}/\text{w}\%$  アテロコラーゲン溶液 ( $29.1 \text{g}$ ) に水 ( $60 \text{g}$ )、 $11 \text{mg}/\text{ml}$  のグルコース溶液 ( $10 \text{ml}$ ) を加え混合した後、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  の pCAHST-1 溶液 ( $80 \text{ml}$ ) を加え混合した。得られた溶液を凍結乾燥した後、

この凍結乾燥品に適当量の蒸留水を加えて練合した。その後、練合品をシリンジに入れ押し出しを行い、さらに乾燥してpCAHST-1の収率74%の製剤を得た。すなわち、1mgあたり17 $\mu$ gのpCAHST-1、300 $\mu$ gのグルコースを含有する棒状の遺伝子製剤を得た。

【0037】

参考例1

アミノ酸を加えないこと以外は、実施例1に記載の操作に従い、乾燥状態の組成物を調製した。

【0038】

参考例2

シュクロースを加えないこと以外は、実施例4に記載の操作に従い、乾燥状態の組成物を調製した。

【0039】

参考例3

グルコースを加えないこと以外は、実施例5に記載の操作に従い、液状の組成物を得た。

【0040】

参考例4

糖類の溶液またはグルタミン酸ナトリウム溶液を加えないこと以外は、実施例6および7に記載の操作に従い、500 $\mu$ gのアテロコラーゲンおよび20 $\mu$ gのpCAHST-1を含有するスポンジ状の組成物を得た。

【0041】

参考例5

グルコース溶液を加えないこと以外は、実施例8に記載の操作に従い、1mgあたり20 $\mu$ gのpCAHST-1を含有する棒状の乾燥組成物を得た。

【0042】

参考例6

pCAHST-1溶液を加えないこと以外は、実施例8に記載の操作に従い、1mgあたり300 $\mu$ gのグルコースを含有する棒状の乾燥組成物を得た。

【0043】

試験例 1

凍結乾燥時におけるアミノ酸の遺伝子分解抑制効果

実施例 1 の遺伝子製剤および参考例 1 の組成物を、凍結乾燥直後に水に溶解し、アガロース電気泳動に付して pCAHST-1 の一次構造を評価した。

アガロース電気泳動は水平型電気泳動ユニット (Mupid、(株)アドバンス) にて、TAE 緩衝液中で 0.8% アガロースゲルを用いて行った。電気泳動後、エチジウムブロマイドでゲルを染色し、トランスイルミネーター上で撮影した。その映像を写真スキャナーで取り込み、一次構造が保持されたスーパーコイル型 pDNA (CC) と切断された pDNA (OC) のバンドを含むすべてのバンドの強度を解析ソフトで算出し、CC の比率、すなわち一次構造保持率 (CC 保持率) を計算した。この場合、無処理の pDNA の CC 保持率を 100 とした。試験例 2 以降においてもアガロース電気泳動を実施する場合にはこの方法を用いた。

【0044】

得られた結果を以下の表 1 および図 1 に示す。図中、CC は一次構造が保持されたスーパーコイル型 pCAHST-1 を示し、OC は切断された pCAHST-1 を示す。各レーンは次を意味する；

- レーン 1: 分子量マーカー ( $\lambda$  Hind III)
- レーン 2: 無添加 (参考例 1)
- レーン 3: グルタミン酸一ナトリウム (実施例 1)
- レーン 4: グリシン (実施例 1)
- レーン 5: アラニン (実施例 1)
- レーン 6: フェニルアラニン
- レーン 7: リジン塩酸塩 (実施例 1)
- レーン 8: 無処理

【0045】

【表 1】

アミノ酸を含有する pCAHST-1 溶液の凍結乾燥後の CC 保持率 (% 無処理)	
処 方	CC 保持率 (% 無処理)

無添加（参考例 1）	7 2
グルタミン酸一ナトリウム（実施例 1）	9 6
グリシン（実施例 1）	7 9
アラニン（実施例 1）	8 3
フェニルアラニン	7 3
リジン塩酸塩（実施例 1）	8 4
無処理	1 0 0

## 【0046】

結果は、グルタミン酸一ナトリウム、グリシン、アラニン、リジン塩酸塩を製剤に加えることで、アミノ酸無添加の製剤に比べて、pCAHST-1の分解が抑えられることを示している。特に、グルタミン酸一ナトリウムを添加した製剤において強い抑制効果が得られた。

## 【0047】

試験例 2凍結乾燥時における糖類の遺伝子分解抑制効果

実施例 2 の遺伝子製剤および参考例 1 の組成物を、凍結乾燥直後に水に溶解し、試験例 1 の操作に従い、アガロース電気泳動に付して pCAHST-1 の一次構造を評価した。得られた結果を以下の表 2 および図 2 に示す。結果は、グルコース、シュークロース、マルトース、ラクトースおよびマンニトールを製剤に加えることで、糖類無添加の製剤に比べて pCAHST-1 の分解が大幅に抑えられることを示している。

## 【0048】

## 【表 2】

糖類を含有する pCAHST-1 溶液の凍結乾燥後の CC 保持率（% 無処理）

処 方	CC 保持率（% 無処理）
無添加（参考例 1）	7 8
グルコース（実施例 2）	9 5
シュークロース（実施例 2）	9 6
マルトース（実施例 2）	9 5

ラクトース（実施例 2）	100
マンニトール（実施例 2）	95
無処理	100

【0049】

図 2 中、CC は一次構造が保持されたスーパーコイル型 pCAHST-1 を示し、OC は切断された pCAHST-1 を示す。各レーンは次を意味する；

レーン 1：分子量マーカー（ $\lambda$  Hind III）

レーン 2：無添加（参考例 1）

レーン 3：グルコース（実施例 2）

レーン 4：シュクロース（実施例 2）

レーン 5：マルトース（実施例 2）

レーン 6：ラクトース（実施例 2）

レーン 7：マンニトール（実施例 2）

レーン 8：無処理

【0050】

### 試験例 3

凍結乾燥時におけるカルボキシル基 2 個以上を含む有機酸類およびアミノ酸の遺伝子分解抑制効果

実施例 3 の遺伝子製剤および参考例 1 の組成物を凍結乾燥直後に水で溶解し、試験例 1 に記載の操作に従って、アガロース電気泳動に付して pCAHST-1 の一次構造を評価した。得られた結果を以下の表 3 および図 3 に示す。結果は、グルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム二水和物あるいはクエン酸三ナトリウム二水和物を製剤に加えることで、有機酸類無添加の製剤に比べて pCAHST-1 の分解が大幅に抑えられることを示している。

【表 3】

カルボキシル基 2 個以上を含む有機酸類およびアミノ酸 を含有する pCAHST-1 緩衝液の凍結乾燥後の CC 保持率（% 無処理）	
処 方	CC 保持率（% 無処理）
無添加（参考例 1）	76



グルタミン酸一ナトリウム (実施例 3)	103
アスパラギン酸ナトリウム (実施例 3)	91
酒石酸ナトリウム二水和物 (実施例 3)	95
クエン酸三ナトリウム二水和物 (実施例 3)	102
無処理	100

## 【0051】

図 3 中、CC は一次構造が保持されたスーパーコイル型 pCAHST-1 を示し、OC は切断された pCAHST-1 を示す。各レーンは次を意味する；

- レーン 1: 分子量マーカー ( $\lambda$  Hind III)  
レーン 2: 無添加 (参考例 1)  
レーン 3: グルタミン酸一ナトリウム (実施例 3)  
レーン 4: アスパラギン酸ナトリウム (実施例 3)  
レーン 5: 酒石酸ナトリウム二水和物 (実施例 3)  
レーン 6: クエン酸三ナトリウム二水和物 (実施例 3)  
レーン 7: 無処理

## 【0052】

試験例 4

カチオン性脂質を含有する遺伝子溶液の凍結乾燥時におけるシュークロースの遺伝子分解抑制効果

実施例 4 の遺伝子製剤および参考例 2 の組成物を凍結乾燥直後に水で溶解し、試験例 1 の操作に従ってアガロース電気泳動に付して pCAHST-1 の一次構造を評価した。得られた結果を以下の表 4 および図 4 に示す。結果は、シュークロースを製剤に加えることで、無添加の製剤に比べて pCAHST-1 の分解が抑制されることを示している。

【表 4】

カチオン性脂質を含有する pCAHST-1 溶液の凍結乾燥後の CC 保持率 (% 無処理)

処 方	CC 保持率 (% 無処理)
無添加 (参考例 2)	69
シュークロース (実施例 4)	100

無処理

100

【0053】

図4中、CCは一次構造が保持されたスーパーコイル型pCAHST-1を示し、OCは切断されたpCAHST-1を示す。各レーンは次を意味する；

レーン 1：分子量マーカー（λHind III）

レーン 2：無添加（参考例2）

レーン 3：シュークロース（実施例4）

レーン 4：無処理

【0054】

#### 試験例5

##### 40℃保存時におけるグルコースの遺伝子分解抑制効果（1）

実施例2の遺伝子製剤のうちグルコース処方の乾燥状態の製剤および参考例1の組成物を40℃で1、2、および4週間保存した。保存後のpCAHST-1の一次構造を試験例1の操作に従ってアガロース電気泳動で評価した。得られた結果を以下の表5および図5に示す。結果は、グルコースを製剤に加えることで、グルコース無添加の製剤に比べ、係る条件下でのpCAHST-1の保存安定性が大幅に改善されることを示している。

【表5】

グルコースを含有するpCAHST-1乾燥品の40℃保存後のCC保持率（%無処理）

処 方	CC保持率（%無処理）
無添加（参考例1／40℃－1週間）	67
無添加（参考例1／40℃－2週間）	56
無添加（参考例1／40℃－4週間）	34
グルコース（実施例2／40℃－1週間）	92
グルコース（実施例2／40℃－2週間）	91
グルコース（実施例2／40℃－4週間）	71
無処理	100

【0055】

図5中、CCは一次構造が保持されたスーパーコイル型pCAHST-1を示し、OC

は切断されたpCAHST-1を示す。各レーンは次を意味する；

- レーン 1：分子量マーカー ( $\lambda$  Hind III)  
 レーン 2：無添加 (参考例 1 / 40℃ - 1週間)  
 レーン 3：無添加 (参考例 1 / 40℃ - 2週間)  
 レーン 4：無添加 (参考例 1 / 40℃ - 4週間)  
 レーン 5：グルコース (実施例 2 / 40℃ - 1週間)  
 レーン 6：グルコース (実施例 2 / 40℃ - 2週間)  
 レーン 7：グルコース (実施例 2 / 40℃ - 4週間)  
 レーン 8：無処理

【0056】

#### 試験例 6

##### 37℃保存時におけるシュークロースの遺伝子分解抑制効果

実施例 4 の遺伝子製剤および参考例 2 の組成物を 37℃で 4 週間保存した。保存後のpCAHST-1の構造を試験例 1 記載のアガロース電気泳動で評価した。得られた結果を以下の表 6 および図 6 に示す。結果は、シュークロースを製剤に加えることで、シュークロース無添加の製剤に比べ、係る条件下でのpCAHST-1の保存安定性が大幅に改善されることを示している。

【表 6】

カチオン性脂質を含有するpCAHST-1溶液の乾燥品

37℃-4 週間保存後のCC保持率 (%無処理)

処 方	CC保持率 (%無処理)
無添加 (参考例 2 / 37℃ - 4 週間)	8.5
シュークロース (実施例 4 / 37℃ - 4 週間)	67
無処理	100

【0057】

図 6 中、CCは一次構造が保持されたスーパーコイル型pCAHST-1を示し、OCは切断されたpCAHST-1を示す。各レーンは次を意味する；

- レーン 1：分子量マーカー ( $\lambda$  Hind III)  
 レーン 2：無添加 (参考例 2 / 37℃ - 4 週間)

レーン 3: シュークロース (実施例 4 / 37℃ - 4 週間)

レーン 4: 無処理

【0058】

#### 試験例 7

##### 40℃保存時におけるグルコースの遺伝子分解抑制効果 (2)

実施例 5 の液状遺伝子製剤および参考例 3 の組成物を 40℃ で 4 週間保存した。保存後の pCAHST-1 の一次構造を試験例 1 記載のアガロース電気泳動で評価した。得られた結果を図 7 に示す。結果は試験例 5 における乾燥製剤と同様に、グルコースを製剤に加えることで、グルコース無添加の製剤に比べ、係る条件下での pCAHST-1 の保存安定性が大幅に改善されることを示している。

【0059】

図 7 中、CC は一次構造が保持されたスーパーコイル型 pCAHST-1 を示し、OC は切断された pCAHST-1 を示す。各レーンは次を意味する；

レーン 1: 無処理

レーン 2: グルコース (実施例 5 / 40℃ - 4 週間)

レーン 3: 無添加 (参考例 3 / 40℃ - 4 週間)

レーン 4: 分子量マーカー ( $\lambda$  Hind III)

【0060】

#### 試験例 8

##### コラーゲン含有時における糖類等の遺伝子分解抑制効果 (1)

実施例 7 のスポンジ状の遺伝子製剤および参考例 4 のスポンジ状の組成物を 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液で加温下に溶解し、コラーゲナーゼで処理した。処理後、試験例 1 に記載のようにしてアガロース電気泳動に付して pCAHST-1 の一次構造を評価した。その結果、グルコース、シュークロースおよびグルタミン酸一ナトリウムを製剤に加えることで、糖類無添加の製剤に比べて pCAHST-1 の分解を大幅に抑えることができた (図 8、表 7)。

【表 7】

コラーゲン、糖類およびアミノ酸を含有する

pCAHST-1 溶液の凍結乾燥後の CC 保持率 (% 無処理)

処 方	CC保持率 (%無処理)
無添加 (参考例 4)	85
グルコース (実施例 7)	94
シュークロース (実施例 7)	95
グルタミン酸一ナトリウム (実施例 7)	95
無処理	100

## 【0061】

図 8 中、CC は一次構造が保持されたスーパーコイル型 pCAHST-1 を示し、OC は切断された pCAHST-1 を示す。各レーン は次を意味する；

- レーン 1：分子量マーカー ( $\lambda$  Hind III)  
レーン 2：グルコース (実施例 7)  
レーン 3：シュークロース (実施例 7)  
レーン 4：グルタミン酸一ナトリウム (実施例 7)  
レーン 5：無添加 (参考例 4)  
レーン 6：無処理

## 【0062】

試験例 9コラーゲン含有時における糖類等の遺伝子分解抑制効果 (2)

実施例 8 の棒状の遺伝子製剤および参考例 5 の棒状の組成物を 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 25mM Tris-HCl (pH7.4) 溶液で加温下で溶解し、コラゲナーゼで処理した。処理後、試験例 1 に記載のようにしてアガロース電気泳動に付し、pCAHST-1 の構造を評価した。その結果、グルコースを製剤に加えることで、グルコース無添加の製剤に比べて pCAHST-1 の分解を大幅に抑えることができた (図 9、表 8)。

【表 8】

棒状組成物中に含まれる pCAHST-1 の CC 保持率 (%無処理)

処 方	CC保持率 (%無処理)
無添加 (参考例 5)	66
グルコース (実施例 8)	92

無処理

100

【0063】

図9中、CCは一次構造が保持されたスーパーコイル型pCAHST-1を示し、OCは切断されたpCAHST-1を示す。各レーンは次を意味する；

レーン 1：分子量マーカー ( $\lambda$  Hind III)

レーン 2：無添加① (参考例5)

レーン 3：無添加② (参考例5)

レーン 4：グルコース① (実施例8)

レーン 5：グルコース② (実施例8)

レーン 6：無処理

【0064】

#### 試験例10

##### 安定な遺伝子製剤を用いた遺伝子導入

実施例8の棒状の遺伝子製剤 (アテロコラーゲン/グルコース-pCAHST-1) および参考例5の棒状の組成物 (アテロコラーゲン-pCAHST-1) をそれぞれ50  $\mu$ gのpCAHST-1を含有するように切断した。これらをICRマウス (雌性、6-7週齢) の右大腿部筋肉内に投与した (投与群1：実施例8の遺伝子製剤、投与群2：参考例5の組成物)。また、50  $\mu$ gのpCAHST-1を含有するリン酸緩衝液100  $\mu$ lもマウス右大腿部筋肉内に投与した (投与群3)。

インビボにおける徐放効果を調べるため、血中pCAHST-1の検出、血中および投与部位のHST-1量および血中の血小板数の3つの測定値を利用した。血中のpCAHST-1はPCR法で検出し、血中および投与部位 (筋肉組織中) のHST-1量はELISA法で測定し、血中の血小板数は顕微鏡下でのカウントにて、それぞれ経時的に行った。

PCR法では、pCAHST-1 (約8 kbp) 中の262 bpを検出するプローブを使用し、Ampridirect法 (島津製作所) を用いた。測定限界は、サザンブロッティングで1 pg/5  $\mu$ l、エチジウム染色で2 pg/5  $\mu$ lであった。ELISA法では、FGF4キット (R&Dシステムズ社、アメリカ合衆国、検出限界20 pg/ml) を使用した。血小板数の測定は、採血後、血小板以外の血球成分を分解処理し、顕微鏡下でカウ

トすることにより実施した。

【0065】

PCR法による血中pCAHST-1の測定結果を図10に示す。投与群1では、血中でpCAHST-1は投与後6時間から検出され、その後38日間に亘って検出された。投与群2では、血中でpCAHST-1は投与後6時間から検出され、その後18日間に亘って検出された。投与群3では、血中でpCAHST-1は投与後7日間のみ検出された。

血中および投与部位でのHST-1量の測定結果をそれぞれ図11、図12に示す。図11中、各記号は次を意味する； 白抜き丸：アテロコラーゲン／グルコース-pCAHST-1(投与群1、実施例8)、黒塗り丸：アテロコラーゲン-pCAHST-1(投与群2、参考例5)、黒塗り四角：pCAHST-1を含有するリン酸緩衝液(投与群3、対照例)、白抜き四角：アテロコラーゲン／グルコース(参考例6)。

図12中、各記号は次を意味する； 白抜き丸：アテロコラーゲン／グルコース-pCAHST-1(投与群1、実施例8)、黒塗り丸：アテロコラーゲン-pCAHST-1(投与群2、参考例5)、黒塗り四角：pCAHST-1を含有するリン酸緩衝液(投与群3、対照例)、白抜き四角：アテロコラーゲン／グルコース(参考例6)。

【0066】

投与群1では、HST-1量は血中および投与部位共に投与後増加し、30日後に最大に達した後徐々に減少したが、60日後も検出された。投与群2では、投与群1と同様に血中および投与部位でのHST-1量は投与後増加し、30日後に最大に達した後徐々に減少し40日後殆ど検出限界となり、総体的に投与群1に比べて産生されたHST-1量は少なかった。投与群3では、血中および投与部位でのHST-1量は、投与後増加し、10日後に最大に達した後徐々に減少し、30日後には検出されなかった。

【0067】

血中の血小板数を経時的に測定した結果(図13)、投与群1では、血小板数は投与後増加し、30日後に最大に達した後徐々に減少したが、60日後も増加傾向を維持した。投与群2では、血小板数は投与後徐々に増加し、14日後に最大に達した後減少し、28日以降も低値ながら増加傾向を維持した。投与群3では、血小板数は投与後増加し、10日後に最大に達した後徐々に減少し、25日間に正常値に

戻った。

図 13 中、各記号は次を意味する； 白抜き丸：アテロコラーゲン／グルコース-pCAHST-1(投与群 1、実施例 8)、黒塗り丸：アテロコラーゲン-pCAHST-1(投与群 2、参考例 5)、黒塗り四角：pCAHST-1を含有するリン酸緩衝液(投与群 3、対照例)、白抜き四角：アテロコラーゲン／グルコース(参考例 6)。

【0068】

対照として、pCAHST-1を含まない参考例 6 の組成物も同様にマウス右大腿部筋肉内に投与し、投与後、血中および投与部位のHST-1量をELISA法で測定し、血中の血小板数を経時的に測定した。その結果、測定期間中、血中および投与部位でHST-1は検出されなかった。また、測定期間中、血小板数は増加しなかった。このことは、実施例 8 の遺伝子製剤を用いて得られた投与群 1 および投与群 2 でのHST-1の産生および血小板数の増加が、製剤中に含有されたpCAHST-1が細胞内に導入され、細胞内でHST-1の遺伝情報を発現したことによって生じたことを示している。

【0069】

投与群 1 と投与群 3 の結果から、pCAHST-1を単独で投与した場合、HST-1の体内での発現および産生されたHST-1による生物学的な効果は一過的であるのに対して、実施例 8 の遺伝子製剤では長期間pCAHST-1を徐放すると共に、安定に体内で保持してHST-1の発現期間を延長し、かつ産生されたHST-1による生物学的な効果を長期間維持できることが判った。

投与群 1 と投与群 2 の結果から、実施例 8 と参考例 5 の遺伝子製剤では共に、pCAHST-1を単独で投与した場合に比べて、pCAHST-1を徐放すると共にHST-1の発現期間を延長できるが、グルコースを含有する実施例 8 の遺伝子製剤では参考例 5 の遺伝子製剤に比べて、pCAHST-1を安定に体内で保持し、HST-1の発現期間を高い産生量で延長維持し、それによってHST-1による生物学的な効果をより高い状態で長期間維持できることが判った。

【0070】

【発明の効果】

試験例 1 から 9 にて得られた本発明製剤の遺伝子分解抑制(安定化)効果を以



下の表 9 にまとめる。

【表 9】

本発明製剤における遺伝子分解抑制効果

(1) 凍結乾燥時の安定性

① 添加剤がない場合	a)	b)
コントロール	72%	(76%)
アミノ酸類：グリシン	79%	
アラニン	83%	
リジン	84%	
アスパラギン酸		(91%)
グルタミン酸	96%	(103%)

	c)
コントロール	78%
糖類： グルコース	95%
シュクロース	96%
マルトース	95%
ラクトース	100%
マンニトール	95%

	b)
コントロール	76%
有機酸類： 酒石酸	95%
クエン酸	102%

② 添加剤がある場合：

(コラーゲン)	d)
コントロール	85%
安定化剤： グルコース	94%
シュクロース	95%
グルタミン酸	95%

(DMRIE-C) e)

コントロール 69%

安定化剤： シュークロース 100%

[注] a) 試験例 1 (表 1)、b) 試験例 3 (表 3)、c) 試験例 2 (表 2)、  
d) 試験例 8 (表 7)、e) 試験例 4 (表 4)

【0071】

(2) 凍結乾燥製剤の保存安定性

① 添加剤がない場合： c) f) f) f)  
(40℃) (凍乾時) 1週間後 2週間後 4週間後  
コントロール (78%) 67% 56% 34%  
安定化剤： グルコース  
(95%) 92% 91% 71%

② 添加剤 (DMRIE-C) がある場合：  
(37℃) e) g)  
(凍乾時) 4週間後  
コントロール (69%) 8.5%  
安定化剤： シュークロース  
(100%) 67%

[注] f) 試験例 5 (表 5)、g) 試験例 6 (表 6)

【0072】

(3) ゲル化・練合わせ時の安定性

(凍乾品の練合わせによる棒状製剤形成時)

d) h)  
(凍乾時) 棒状製剤形成後  
コントロール (85%) 66%  
安定化剤： グルコース  
添加剤： コラーゲン (95%) 92%

[注] h) 試験例 8 (表 8)

(4) 水溶液製剤の保存安定性 I)  
(40℃) 4週間後

コントロール

ベクター消失

安定化剤：グルコース

添加剤：DMRIE-C

ベクター残存

[注] I) 試験例 7 (図 7)

【図面の簡単な説明】

【図 1】 アミノ酸を含有する遺伝子製剤（実施例 1）に含まれる pCAHST-1 の一次構造の評価結果を示す電気泳動の図面に代わる写真である。

【図 2】 糖類を含有する遺伝子製剤（実施例 2）に含まれる pCAHST-1 の一次構造の評価結果を示す電気泳動の図面に代わる写真である。

【図 3】 カルボキシル基 2 個を含む有機酸類およびアミノ酸を含有する遺伝子製剤（実施例 3）に含まれる pCAHST-1 の一次構造の評価結果を示す電気泳動の図面に代わる写真である。

【図 4】 糖類および遺伝子導入促進成分を含有する遺伝子製剤（実施例 4）に含まれる pCAHST-1 の一次構造の評価結果を示す電気泳動の図面に代わる写真である。

【図 5】 糖類を含有する遺伝子製剤（実施例 2）を 40℃ で保存した後、pCAHST-1 の一次構造を評価した結果を示す電気泳動の図面に代わる写真である。

【図 6】 糖類および遺伝子導入促進成分を含有する遺伝子製剤（実施例 4）を 37℃-4 週間保存した後、pCAHST-1 の一次構造を評価した結果を示す電気泳動の図面に代わる写真である。

【図 7】 糖類および遺伝子導入促進成分を含有する溶液状遺伝子製剤（実施例 5）を 40℃-4 週間保存した後、pCAHST-1 の一次構造を評価した結果を示す電気泳動の図面に代わる写真である。

【図 8】 コラーゲンを含有するスポンジ状遺伝子製剤（実施例 7）に含まれる pCAHST-1 の一次構造の評価結果を示す電気泳動の図面に代わる写真である。

【図 9】 コラーゲンを含有する棒状の遺伝子製剤（実施例 8）に含まれる pCAHST-1 の一次構造の評価結果を示す電気泳動の図面に代わる写真である。

【図 10】 コラーゲンを含有する棒状の遺伝子製剤（実施例 8）における血中での pCAHST-1 の検出期間を示すグラフである。

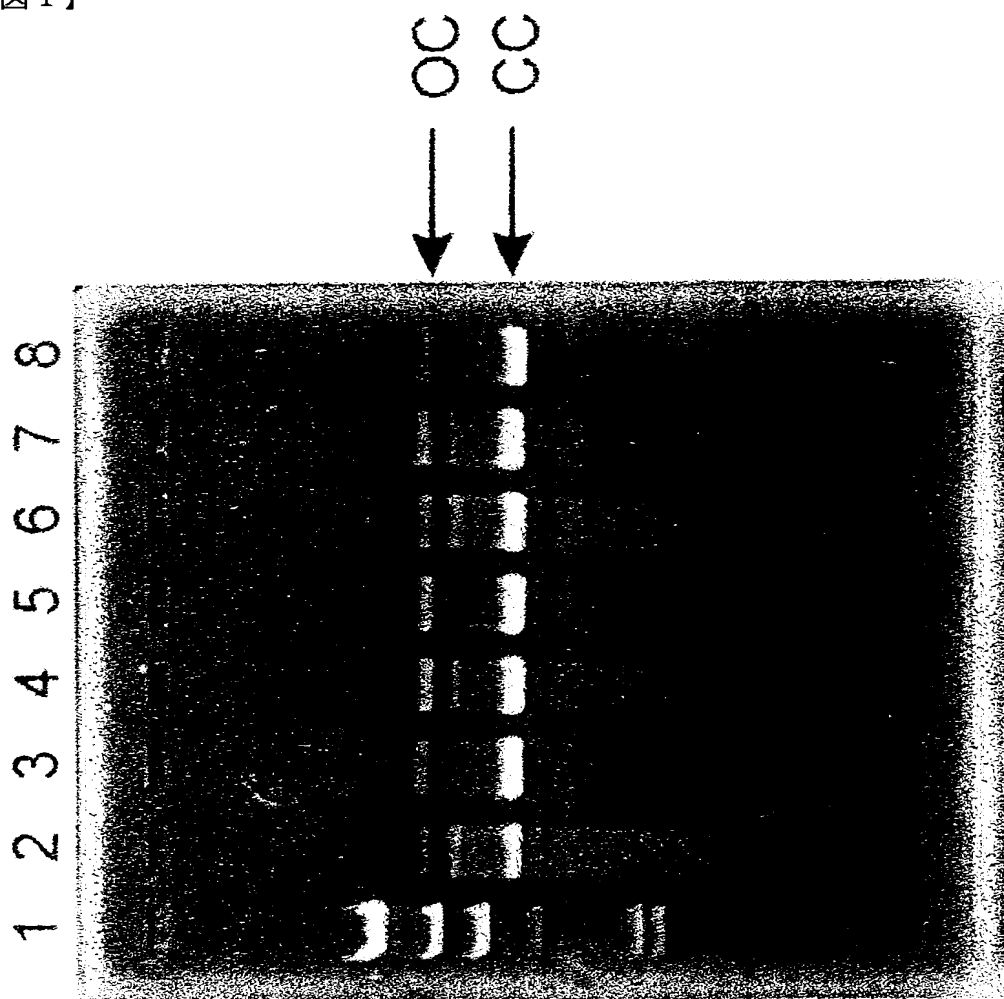
【図 1 1】 コラーゲンを含有する棒状の遺伝子製剤（実施例 8）における血中の HST-1 濃度の経時変化を示すグラフである。

【図 1 2】 試験例 10 における投与部位での HST-1 量の経時変化を示すグラフである。

【図 1 3】 実施例 10 における血中の血小板数の経時変化を示すグラフである。

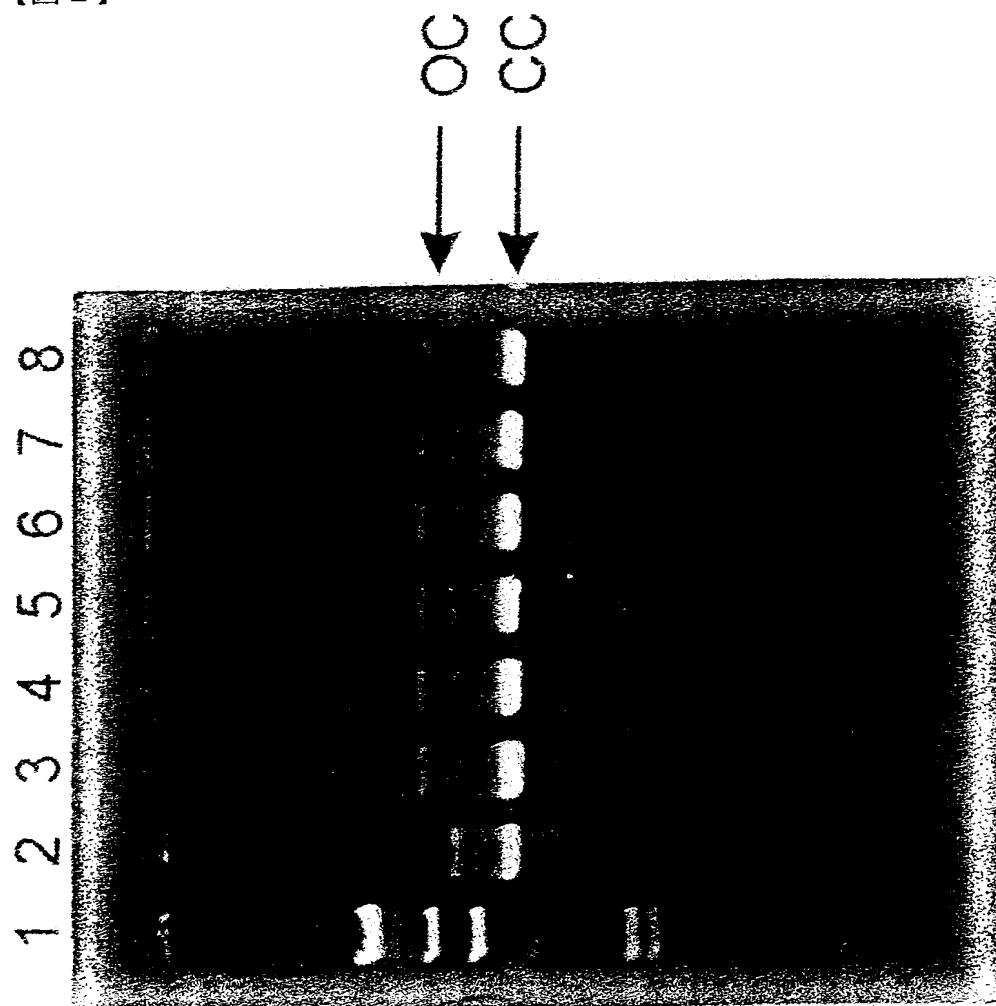
【書類名】 図面

【図1】

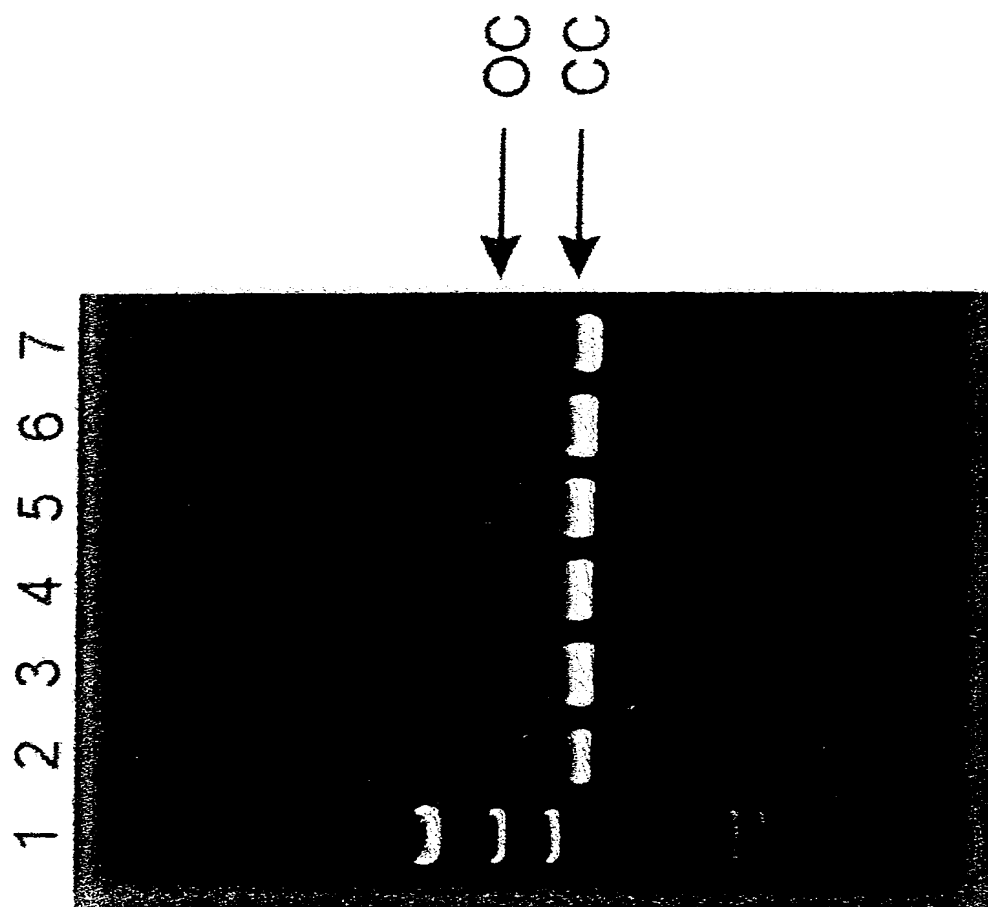


特平 10-141426

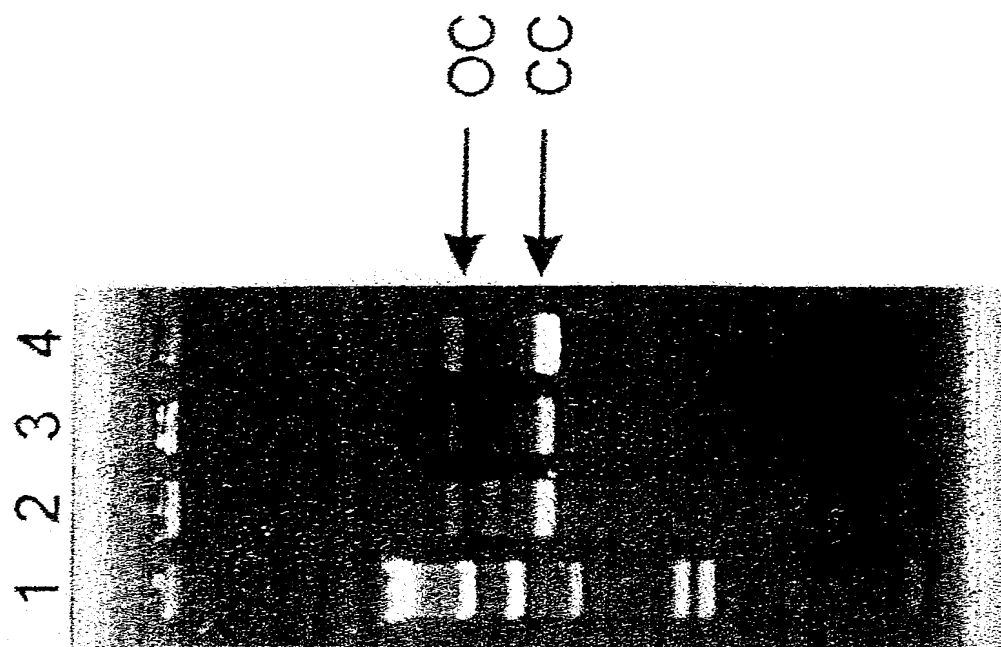
【図2】



【図 3】

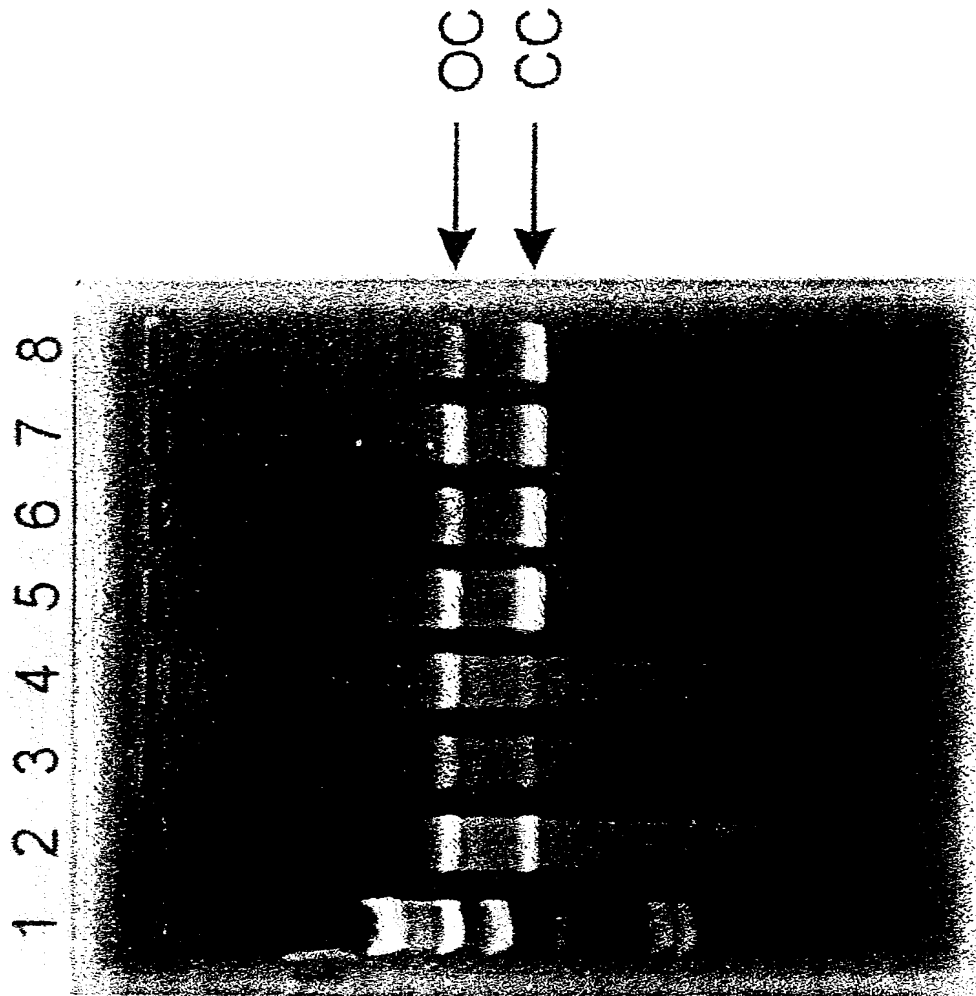


【図4】

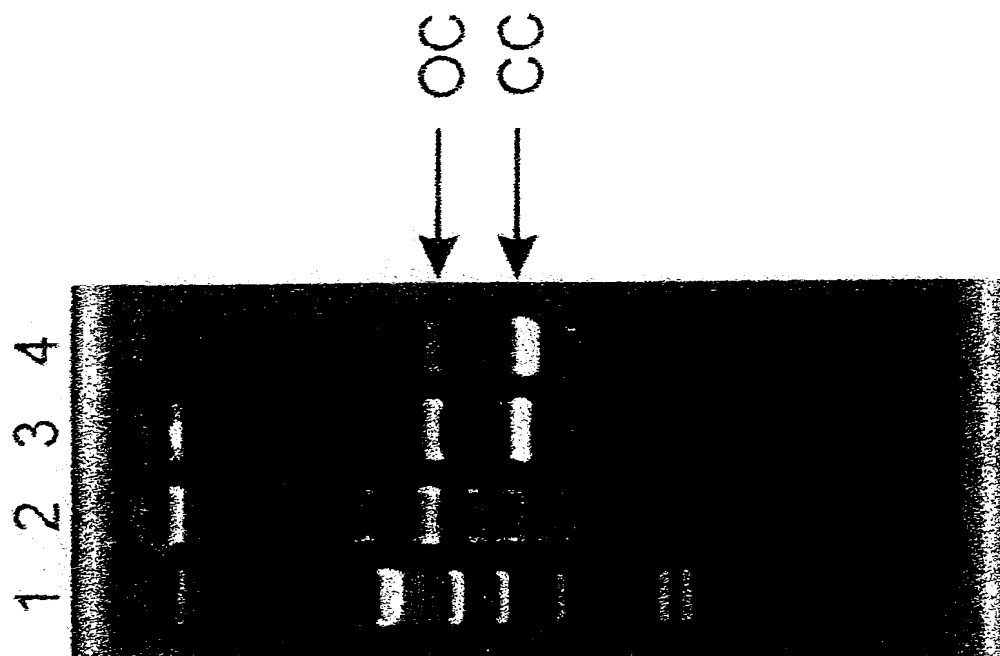




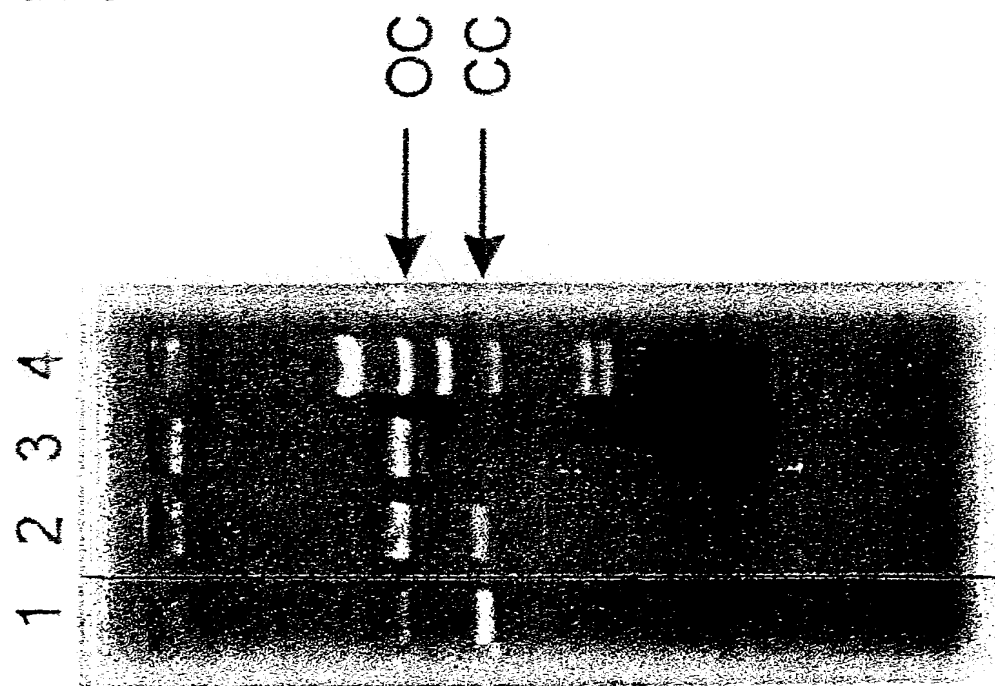
【図5】



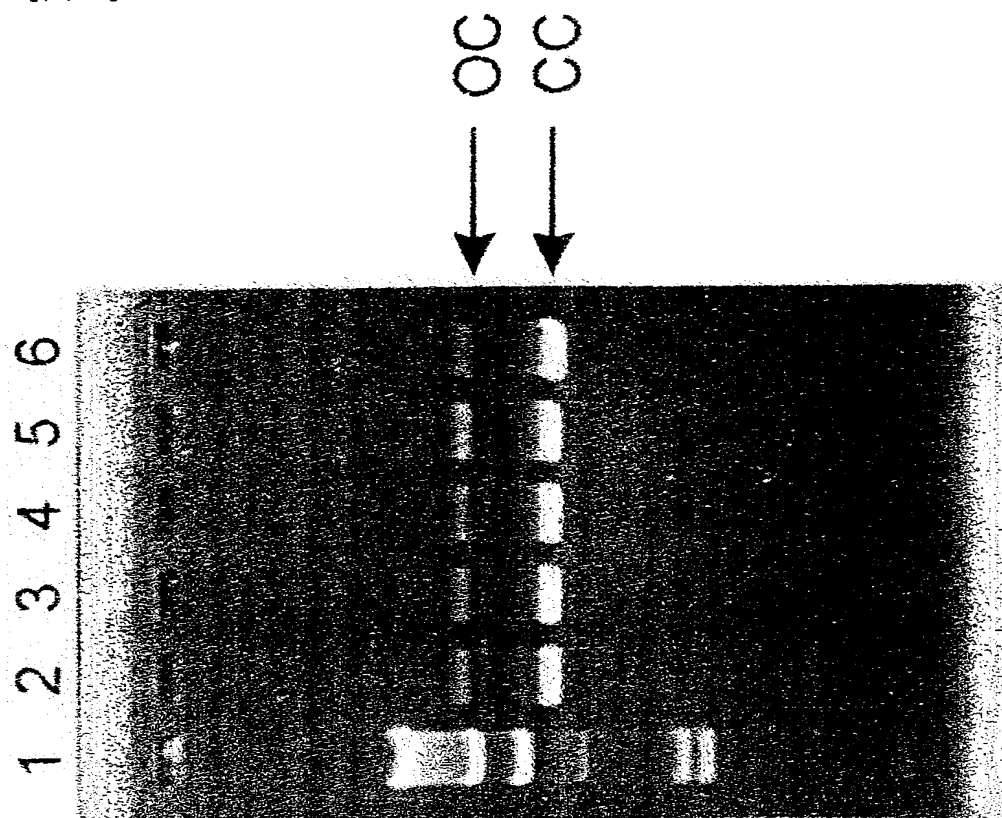
【図6】



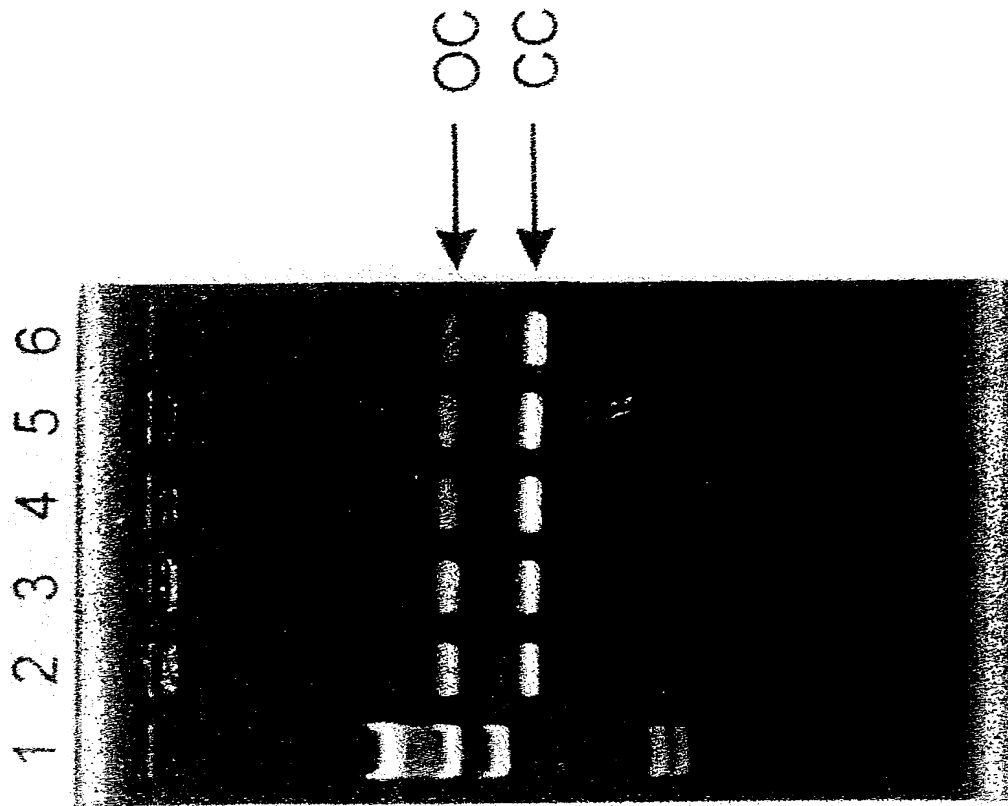
【図7】



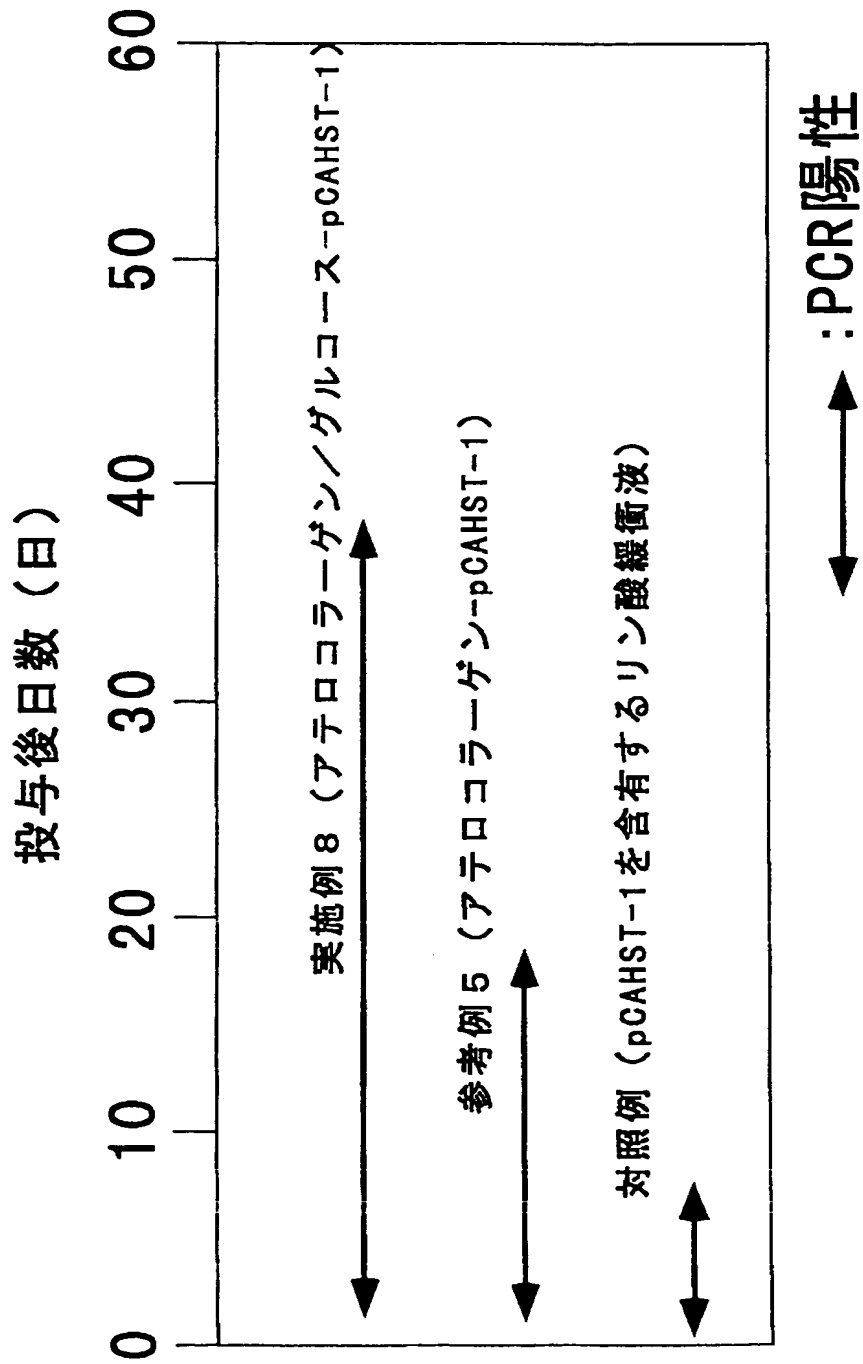
【図8】



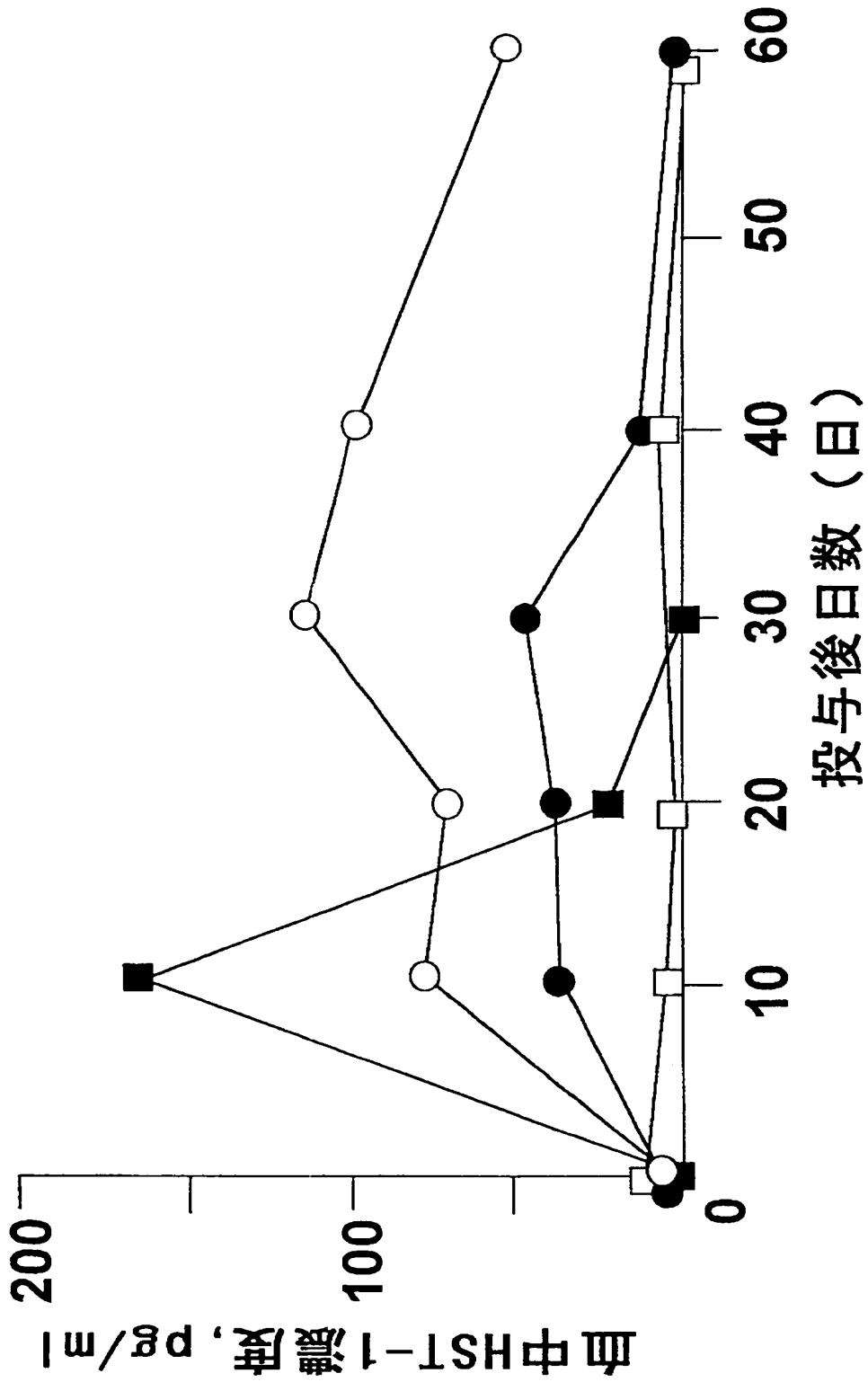
【図9】



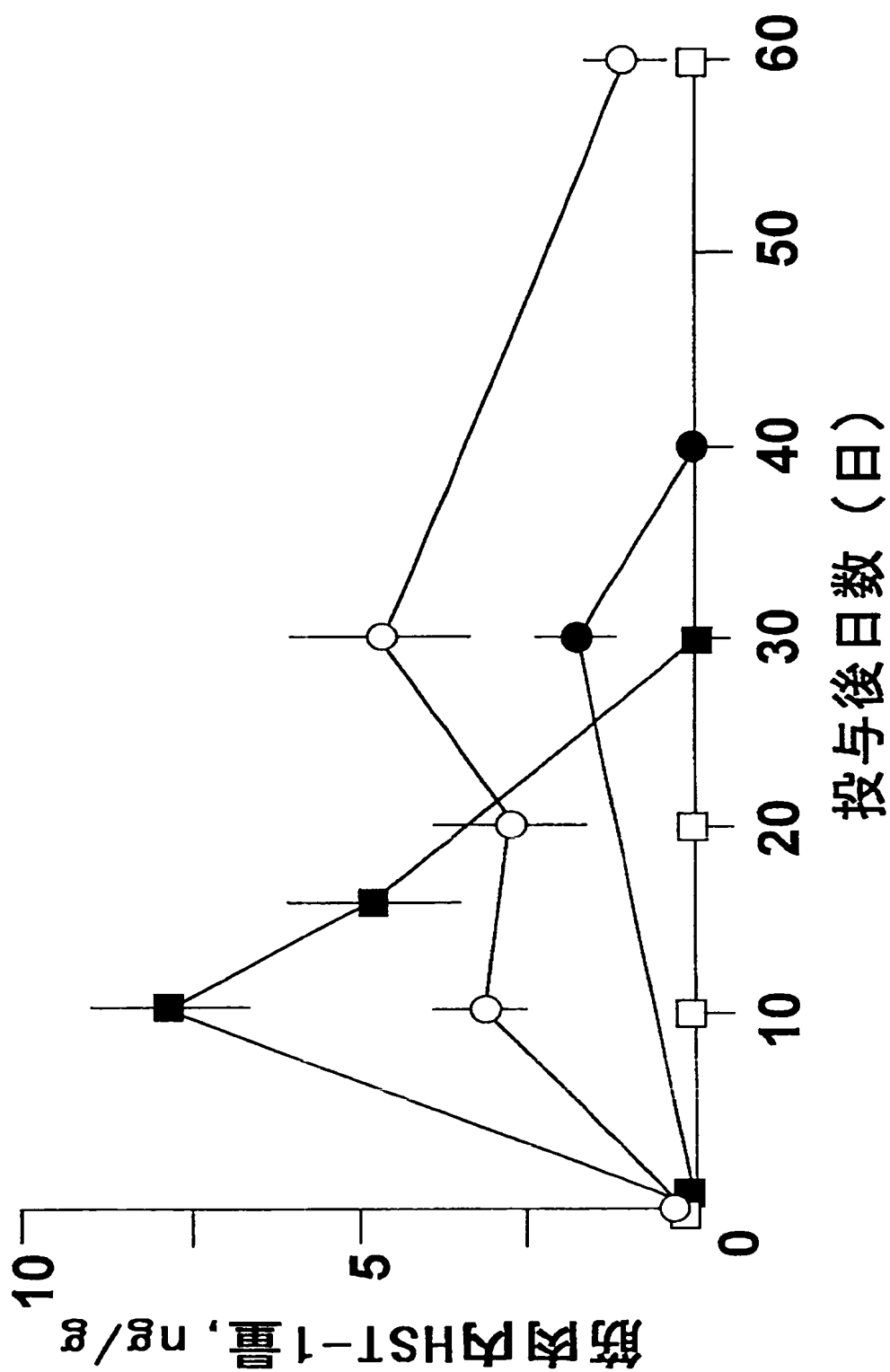
【図 10】



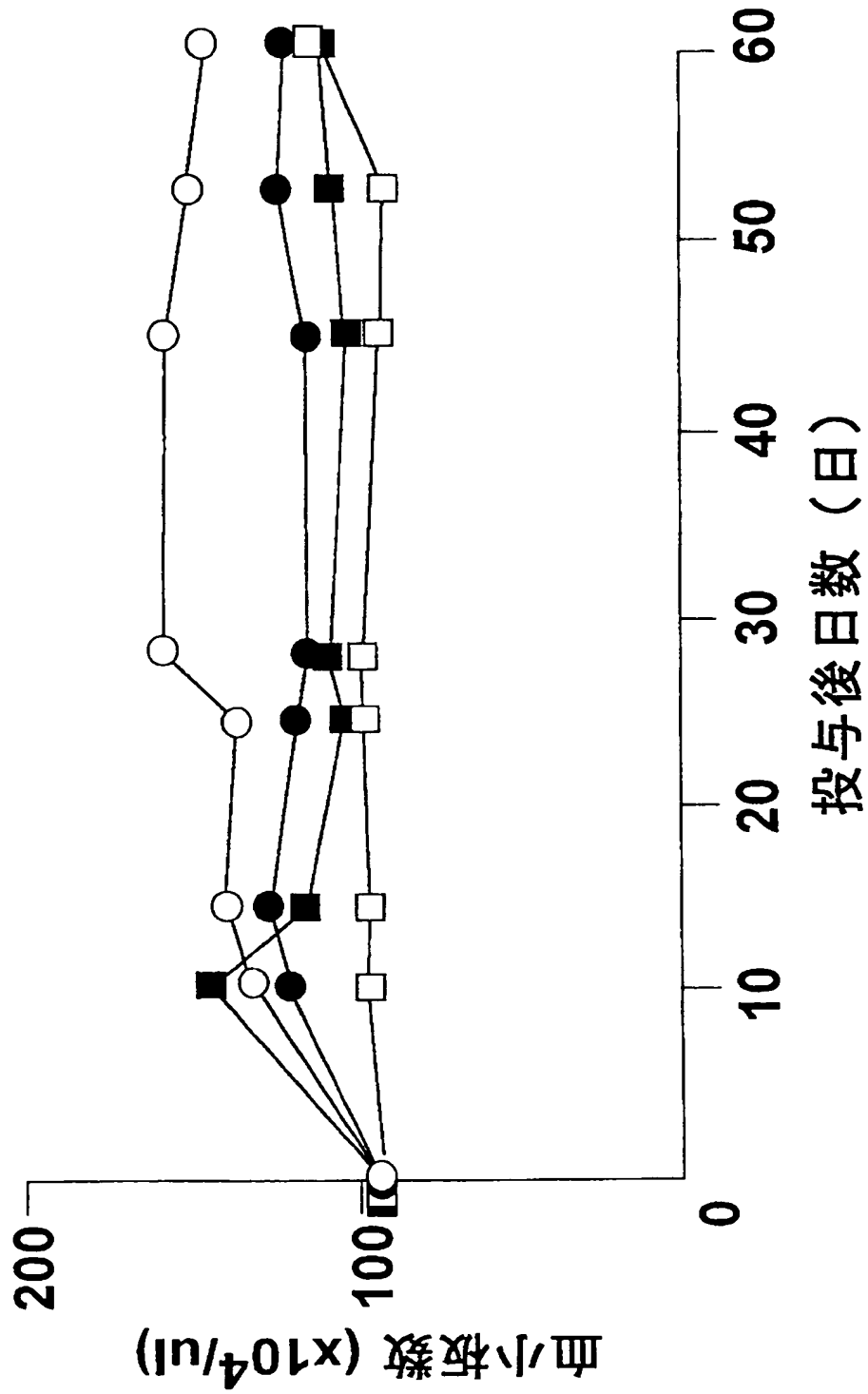
【図11】



【図 12】



【図 13】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝子治療用製剤の製造および保存時における安定性を保持させる。

【解決手段】 少なくとも1種類の糖類および／または少なくとも1種類の非疎水性アミノ酸類および／または少なくとも1種類のカルボキシル基を2個以上有する有機酸類を遺伝子製剤に含ませる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000183370  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号  
【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 591071104  
【住所又は居所】 東京都新宿区下落合3丁目5-18  
【氏名又は名称】 株式会社高研

【代理人】

申請人

【識別番号】 100062144  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビ  
ル 青山特許事務所  
【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】 100068526  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビ  
ル 青山特許事務所  
【氏名又は名称】 田村 恭生

【選任した代理人】

【識別番号】 100103230  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビ  
ル 青山特許事務所  
【氏名又は名称】 高山 裕貢

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名 住友製薬株式会社

特平10-141426

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591071104]

1. 変更年月日	1991年 4月 8日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都新宿区下落合3丁目5-18
氏 名	株式会社高研